

## 山梨県若手研究者奨励事業費 研究成果概要書

所属機関 山梨学院大学健康栄養学部職名・氏名 名取 貴光

## 1 研究テーマ

ヒストン脱アセチル化を介して寿命延長作用を発揮する食品成分の探索

## 2 研究の目的

近年、Hdac 阻害薬がヒストンのアセチル化を介して寿命延長効果を発揮していることが明らかになっている。また、ポリフェノール類など一部の食品成分にも Hdac を阻害する活性のあることが報告されており、寿命延長に関わる遺伝子の発現がエピジェネティックな調節を受けている可能性が考えられる。本研究では、日常的に摂取している食品、すなわち、山梨県内で栽培されている農産物を主な対象として、ヒストンアセチル化を介して寿命延長効果を発揮する分子を見つけ出し、次いで、生体内におけるその作用メカニズムの解明を行うことを目的とした。

## 3 研究の方法

### (1) 蛍光ペプチドアッセイを用いたHdac活性阻害食品成分の探索

食品に含まれる生理活性物質は種類も多く構造も複雑であり、単離・精製には長い時間と労力が必要である。そこで本研究では人工の蛍光ペプチドを用いたアッセイ法を利用して簡便かつ迅速に食品由来Hdac阻害活性分子のスクリーニングを試みた。

山梨県産果樹類等の試料を凍結乾燥した後に粉碎し、メタノールで抽出を行った。ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、ブタノール等で分画し、得られた画分の Hdac 活性に対する影響について、蛍光ペプチドアッセイ系を用いて評価を行った。Hdac 活性を阻害する分子を含む画分の探索を行った。なお、標準品として入手可能なポリフェノール類に関しても同様に Hdac 阻害活性の有無について検討を行った。

### (2) 線虫を用いた寿命延長効果分子の同定

線虫は、ライフサイクルが約 30 日と短く、わずか 1 ヶ月程度で寿命解析が可能である。試料無添加の餌を与えたコントロール群を対照とし、試料を混合した餌を与えた群の累積生存率を算出し、カプラン・マイヤー法を用いて生存分析を行った。同時に細胞体の異常や生殖能など安全性の確認を行い、寿命延長効果を発揮する活性分子を含む画分を選定した。

### (3) 線虫を用いた寿命延長効果の分子メカニズムの解析

活性分子を含んだ画分の投与群に対して、老化マーカー遺伝子の発現解析（リアルタイムPCR及び蛍光観察）を行い、Hdacにより制御される寿命延長関連遺伝子の解析を行った。また、関連遺伝子とそのシグナル系の変異体を用いて寿命延長効果への関与を確認した。更に、GFPを遺伝子下流

## 留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

に組み込んだトランスジェニック線虫を入手して活性分子を含む画分添加による遺伝子発現の局在と経時的変化を確認した。

#### 4 研究の成果

はじめに、山梨県の特産品であるモモおよびブドウに豊富に含まれるアントシアニンのHdac活性への影響について検討を行った。その結果、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、ペチュニジン、シアニジン-3-グルコシド、ペラルゴニジン-3-グルコシドに有意なHdac阻害活性のあることが確認された。一方、ウメ(甲州小梅)由来の抽出液の中からHdac阻害活性成分の探索を試みたところ、DCM画分とBuOH画分に有意なHdac阻害活性を確認した。そこで、これらHdac阻害活性を示したアントシアニン類およびウメ由来のDCMとBuOH画分について線虫の寿命に対する影響を検討したところ、アントシアニン類では、デルフィニジンおよびペオニジン、ペチュニジン、また、ウメ由来の分画物においては、HexaneとDCM画分に顕著な寿命延長効果が確認された。

次に、アントシアニン類、ウメ由来のDCMおよびBuOH画分のHdac酵素への関与を明らかにするため、ヒトHdac遺伝子の線虫ホモログであるhda-2,3,4,10の変異体を用いて寿命延長効果の検討を行った。デルフィニジンはhda-2,-4,-10に対し寿命延長効果がみとめられ、ペオニジンはhda-4においてのみ寿命延長効果がみとめられた。また、ペチュニジンはいずれにおいても寿命延長効果はみとめられなかった。デルフィニジンの寿命延長効果はhda-3、ペオニジンの寿命延長効果はhda-2およびhda-3、had-10、ペチュニジンの寿命延長効果はhda-2,3,4,10を介したエピジェネティック調節である可能性が示唆された。一方、ウメから分画したDCM画分は、hda-2においてのみ寿命延長効果がみとめられなかったことから、この画分の寿命延長効果はhda-2を介したエピジェネティック調節である可能性が考えられた。また、BuOH画分は、hda-10においてのみ寿命延長効果がみとめられたことから、この画分の寿命延長効果はhda-2,3,4を介したエピジェネティック調節である可能性が示唆された。

ウメ由来 DCM 画分は Hda-2 にのみ関与して寿命延長効果を発揮していたことから、DCM 画分を用いて寿命延長に対する作用メカニズムの解析を行った。DCM 画分の添加により、hsp70 および sod1、sir2.1 の発現量の上昇と、daf-2 および daf-16、skn-1 の発現量の減少が確認された。また、DCM 画分に酸化ストレスに対する耐性増強効果が確認された。ショウジョウバエにおいて Hdac 阻害剤が hsp70 の発現を増強することが報告されており、ヒストンアセチル化の亢進により hsp70 と sod1 の発現が増強され、寿命延長が発揮されている可能性が示唆された。また、寿命はカロリー制限やインスリン-IGF1 経路、NF- $\kappa$ B 経路などにより制御されていることが知られている。そこで、インスリン-IGF1 シグナル系の重要な転写因子である daf-16 の関与について検討を行った。哺乳類 FOXO の線虫ホモログの変異体 (daf-16) と daf-16 遺伝子下流に GFP を組み込んだトランスジェニック体を用いてウメ由来 DCM 画分の影響を検討したところ、daf-16 において有意な寿命延長効果がみとめられた。また、蛍光顕微鏡を用いて daf-16 の局在を観察したが有意な核内移行はみとめられなかった。従って、DCM 画分による寿命延長効果はインスリン/IGF1 経路には寄らないものと考えられた。

次に、寿命延長効果を発揮している分子を同定するため、ウメ由来 DCM 画分の HPLC 分析を行った。分析の結果、DCM 画分より寿命延長の候補分子としてリグナン類(ピノレシノール、ラリシレシノール、セコイソラリシレシノール、シリンガレシノール)を同定した。続いて、リグナン類のヒストンア

#### 留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

セチル化への関与について検討を行ったところ、Hdac 活性が増強される結果が得られた。また、線虫の寿命延長に対する効果を確認したところ、リグナン類はいずれも線虫の寿命を延長した。

次に、hda-2 および hda-3、hda-4、hda-10 のそれぞれの変異体 (欠損株) を用いてリグナン類の線虫寿命への影響について検討を行った。その結果、シリングレシノールにのみ hda-4 における寿命延長効果が確認された。また、サーチュイン遺伝子 (Sirt1) の線虫ホモログ Sir2.1 の変異体 (欠損株) を用いてリグナン類の寿命延長への影響について検討を行ったところ、ピノレシノール、ラリシレシノール、セコイソラリシレシノールに有意な寿命延長効果がみとめられた。従って、リグナン類のピノレシノールおよびラリシレシノール、セコイソラリシレシノールは、Hdac を介して寿命延長を導いていると考えられる。

以上より、本研究では、Hdac 活性を指標に活性分子の選定を行い、アントシアニン類の中から Hdac 活性を阻害することで寿命延長を示すアントシアニン類、ウメ由来 DCM 画分の中から Hdac 活性を増強することで寿命延長を示すリグナン類を同定した。DCM 画分に含まれる候補分子がヒストンのアセチル化を介して hsp70 および sod1、sir2.1 の発現を制御し、各種ストレスに対する耐性を高め寿命延長を導いている可能性が示唆された。一方、DCM 画分にはリグナン類の他にも数多くのポリフェノール成分が含まれており、リグナン類とは異なり、Hdac 活性阻害を介して寿命延長を導く活性分子が存在する可能性が示唆された。

## 5 今後の展望

本研究では、Hdac 活性を指標に寿命延長を導く活性分子の選定を行い、サーチュイン遺伝子とは異なる新規な寿命延長制御機構の存在、すなわち、Hdac 活性を阻害するものと Hdac 活性を増強するものの2つが存在することが明らかとなった。Hdac 活性を阻害することで寿命延長を示したアントシアニンは食品の代表的な色素成分の一つである。モモやブドウのみならず、イチゴや紫芋など様々な食品、果物や野菜に多く含まれている。今後、作用機序を含めてより詳細な検討を行い、有効分子を特定していく。また、DCM 画分の検討では、予想とは異なる結果が得られた。未同定の Hdac 阻害分子が存在し、それらが線虫の寿命延長を導いている可能性が考えられる。今後、更に分画を進め、Hdac 活性阻害を指標に分子の特定を進めていく。

## 6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

本研究にて得られた研究成果の一部は、日本食品科学工学会平成 29 年度関東支部大会において発表いたしました (シンポジウム講演 1 件「ウメ・モモ果実の新規機能性の探索」、ポスター発表 3 件「ウメ抽出液による線虫 (*C. elegans*) の寿命延長効果」、「ヒストン脱アセチル化を介したアントシアニンの神経機能調節」、「モモ果実によるアミロイド B 凝集抑制及び神経保護効果について」)。

今後は、関連する学会 (日本生化学会、日本農芸化学会など) における発表や、論文雑誌 (日本食品科学工学会または日本農芸化学会誌等) で発表するとともにパソコンホームページを通じて広く社会に発信していきたいと考えています。

### 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。